

4/7/1

DIALOG(R) File 351: Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

012411387

WPI Acc No: 1999-217495/*199919*

Mechanical lysis of microbial cells - by vortexing with small hard balls

Patent Assignee: BIO MERIEUX (INMR); GEN-PROBE INC (GENP-N)

Inventor: CLARK DICKEY K A; COLIN B; JAY C; LOPEZ S; PARIS C; SANTORO L;

CLEUZIAT P

Number of Countries: 084 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
FR 2768743	A1	19990326	FR 9712164	A	19970923	199919 B
WO 9915621	A1	19990401	WO 98IB1475	A	19980923	199920
AU 9890912	A	19990412	AU 9890912	A	19980923	199934
EP 1017784	A1	20000712	EP 98942953	A	19980923	200036
			WO 98IB1475	A	19980923	

Priority Applications (No Type Date): FR 9712164 A 19970923

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

FR 2768743	A1	F	37	C12N-001/06	
------------	----	---	----	-------------	--

WO 9915621	A1	F		C12M-001/33	
------------	----	---	--	-------------	--

Designated States (National): AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CU
CZ DE DK EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IS JP KE KG KP KR KZ LC LK
LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ
TM TR TT UA UG US UZ VN YU ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR
IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SZ UG ZW

AU 9890912	A			C12M-001/33	Based on patent WO 9915621
------------	---	--	--	-------------	----------------------------

EP 1017784	A1	F		C12M-001/33	Based on patent WO 9915621
------------	----	---	--	-------------	----------------------------

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI
LU MC NL PT SE

Abstract (Basic): FR 2768743 A

Method for lysing microorganisms comprises introducing a liquid biological sample containing the microorganisms into a container, adding balls of a material that is relatively hard and inert with respect to biological compounds, and vortexing the mixture. The balls have a diameter of 90-150 μm and are used in an amount such that $V_e = \alpha \cdot V_b$, where V_b = the apparent volume of the balls, V_e = the volume of the liquid sample, $\alpha = 1.4-10$ when the container is cylindrical, and $\alpha = 2.1$ or less when the container is disc-shaped.

USE - This method is used especially to release nucleic acids from bacteria for amplification and assay purposes.

ADVANTAGE - No chemicals are used and nucleic acids are not degraded.

Dwg.0/13

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12M-001/33; C12N-001/06

International Patent Class (Additional): C12M-003/08; C12N-001/20

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 768 743

(21) N° d'enregistrement national : 97 12164

(51) Int Cl⁶ : C 12 N 1/06, C 12 N 1/20

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 23.09.97.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 26.03.99 Bulletin 99/12.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : BIO MERIEUX SOCIETE ANONYME
— FR.

(72) Inventeur(s) : COLIN BRUNO, LOPEZ SOPHIE,
PARIS CECILE et SANTORO LISE.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : GERMAIN ET MAUREAU.

(54) PROCEDE DE LYSE DE MICRO-ORGANISME.

(57) Procédé de lyse de micro-organisme, pour libérer au
moins un composé biologique comprenant une étape de ly-
se, selon laquelle:

- on dispose dans un contenant un échantillon
biologique en milieu liquide, comprenant le micro-orga-
nisme à lyser,

- on dispose dans ledit contenant au moins un matériau
particulaire, relativement dur, et substantiellement inerte
par rapport aux composés biologiques,

- on soumet le mélange de l'échantillon biologique et du
matériau particulaire à un mouvement de type vortex, carac-
térisé en ce que:

- le matériau particulaire comprend des billes ayant un
diamètre compris entre 90 et 150 μ m, et

- $V_e = \alpha \cdot V_b$, avec

V_b = le volume apparent des billes,

V_e = le volume de l'échantillon liquide, et

α est un nombre compris entre 1, 4 et 10 lorsque le con-
tenant est de forme tubulaire, et

α est un nombre inférieur ou égal à 2, 1 lorsque le con-
tenant est de forme disque.

Utilisation du lysat obtenu par le procédé selon l'inven-
tion.

Contenant à usage unique pour la mise en oeuvre du

procédé selon l'invention.

FR 2 768 743 - A1



La présente invention concerne un procédé de lyse de micro-organisme, permettant de manière générale de rompre un micro-organisme, notamment la membrane d'une ou plusieurs cellules, pour libérer au moins un composé biologique, par exemple un matériel nucléaire à traiter ou analyser.

On connaît le procédé généralement utilisé pour lyser les cellules qui consiste essentiellement en ce que:

- on dispose dans un contenant un échantillon biologique en milieu liquide, comprenant le micro-organisme à lyser,

- on dispose dans ledit contenant au moins un matériau particulaire, relativement dur, et substantiellement inerte par rapport aux composés biologiques,

- on soumet le mélange de l'échantillon biologique et du matériau particulaire à un mouvement de type vortex.

Ce procédé utilisé présente certains inconvénients.

On a remarqué que le procédé de lyse utilisé couramment n'est pas suffisamment efficace, notamment la lyse cellulaire s'avère insuffisante en quantité et qualité.

De plus, le procédé employé ne permet pas toujours de lyser des cellules réputées résistantes à la lyse, notamment les cellules des bactéries à Gram+, par exemple celles de Mycobactéries.

De même, la mise en oeuvre du procédé nécessite souvent l'ajout de réactifs supplémentaires tels que par exemple des enzymes et/ou des détergents.

La présente invention a pour objet de remédier aux inconvénients cités ci-dessus. L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de lyse complète, efficace et simple d'un échantillon biologique comprenant même très peu de micro-organismes, sans réactifs supplémentaires au cours de la mise en oeuvre du procédé.

Par exemple, la présente invention a pour objet un procédé simplifié de lyse cellulaire pour libérer directement au moins un composé biologique, notamment les acides nucléiques.

5 Les avantages du procédé de lyse de la présente invention sont en effet une efficacité quantitative et qualitative.

La premier objet de la présente invention est donc un procédé de lyse de micro-organisme, pour libérer au
10 moins un composé biologique comprenant une étape de lyse, selon laquelle:

- on dispose dans un contenant un échantillon biologique en milieu liquide, comprenant le micro-organisme à lyser,

15 - on dispose dans ledit contenant au moins un matériau particulaire, relativement dur, et substantiellement inerte par rapport aux composés biologiques,

- on soumet le mélange de l'échantillon biologique et du matériau particulaire à un mouvement de type vortex, caractérisé en ce que:

- le matériau particulaire a un diamètre compris entre 90 et 150 μm , et

- $V_e = \alpha \cdot V_b$, avec

V_b = le volume apparent des billes ,

25 V_e = le volume de l'échantillon liquide, et

α est un nombre compris entre 1,4 et 10 lorsque le contenant est de forme tubulaire, et

α est un nombre inférieur ou égal à 2,1 lorsque le contenant est de forme disque.

30 Par le procédé selon l'invention, on obtient le composé biologique non détérioré.

Par ailleurs, le procédé selon l'invention est suffisamment efficace pour permettre la lyse d'un seul micro-organisme, ce qui pour beaucoup de procédés
35 d'analyse biologique, notamment pour les techniques

d'amplification ou d'analyse par hybridation de sonde(s), revêt un intérêt particulier.

S'agissant d'un composé biologique de type nucléique, la présente invention apporte l'avantage déterminant de libérer ledit composé de manière accessible à tout réactif le concernant, par exemple une ou des amorces d'amplification, une ou des sondes d'hybridation...

Dans un premier mode de réalisation selon l'invention, le matériau particulaire est constitué de billes de diamètre environ 100 μ m.

Dans un second mode de réalisation selon l'invention, on a:

$V_b < V_e < V_c$, et
15 $V_c = \beta \cdot V_e$, avec
 V_b = le volume apparent des billes ,
 V_e = le volume de l'échantillon liquide,
 V_c = le volume utile du contenant, et
 β est un nombre supérieur ou égal à 2,5.

Les contenants que l'on peut utiliser selon l'invention peuvent être de formats différents, par exemple de forme tubulaire ou de forme disque.

On préfère que le contenant soit de forme tubulaire, de préférence à fond en forme de U. Dans ce mode de réalisation préféré, β est un nombre compris entre 2,5 et 30.

25 Dans un troisième mode de réalisation selon l'invention, les contenants sont de forme disque et de forme tubulaire à fond en forme de U (comme par exemple de type Falcon®) ou à fond tronconique (comme par exemple de type Eppendorf®).

30 Lorsque le contenant est sous forme disque, α est un nombre inférieur ou égal à 2,1, de préférence inférieur ou égal à 1,4 et β est un nombre supérieur ou égal à 9,3.

On préfère encore plus que le contenant soit un tube à fond tronconique tel qu'un tube Eppendorf, α étant

compris entre 1,4 et 10, de préférence entre 1,4 et 3,3, et β étant compris entre 2,5 et 30, de préférence entre 2,5 et 15, de préférence encore entre 3,75 et 15.

On préfère encore plus que le contenant soit un
5 tube à fond en U, tel qu'un tube Falcon, α étant compris entre 1,4 et 10, de préférence entre 1,4 et 3,3, de préférence encore est à 3,3, et β étant compris entre 3 et 30, de préférence entre 12 et 30, de préférence encore égal à 20.

10 Dans un quatrième mode de réalisation selon l'invention, le matériau particulaire comprend d'autres billes ayant un diamètre supérieur à celui desdites billes du contenant. On préfère que le contenant comprenne jusqu'à 10 autres billes. On préfère encore plus que ces
15 autres billes aient un diamètre environ de 2 à 3 mm.

Cette caractéristique complémentaire du procédé selon l'invention permet, pour une efficacité équivalente, en particulier de diminuer ou limiter le temps requis pour l'étape de lyse cellulaire.

20 Cette caractéristique complémentaire permet aussi de rompre des échantillons biologiques complexes, tels que tissus vivants, avant de lyser proprement dit le matériau cellulaire.

Dans un cinquième mode de réalisation selon
25 l'invention, le temps de mise en mouvement de type vortex est au moins égal à 10 secondes, de préférence au moins 20 secondes, avantageusement entre 1 et 5 minutes.

Dans un mode de réalisation préférentiel, le temps de mise en mouvement de type vortex est environ de 2
30 minutes.

Le temps de vortex est adapté de manière à obtenir un pourcentage de lyse au moins supérieur ou égale à 20%.

On préfère encore, selon les spécificités du protocole de lyse utilisé, notamment lorsqu'on ajoute des
35 billes de plus gros diamètre, que le temps de mise en mouvement de type vortex soit d'environ 2 minutes.

Dans un sixième mode de réalisation selon l'invention, les cellules sont des bactéries.

Un second objet de l'invention est l'utilisation du lysat obtenu par le procédé décrit ci-dessus, notamment
5 pour une détection et/ou une quantification de molécules d'acides nucléiques ou une amplification, directe ou après purification des molécules d'ADN et/ou d'ARN.

Ainsi, après amplification, on peut détecter au moins 1.10^2 cellules/ml.

10 Toutefois, l'utilisation du procédé de l'invention n'est pas limité aux techniques précitées.

Un troisième objet de l'invention est un contenant à usage unique, pour la mise en oeuvre d'un procédé décrit précédemment, caractérisé en ce qu'il comprend une charge
15 d'un matériau particulaire adaptée, en fonction d'une quantité prédéterminée de l'échantillon biologique, à la mise en oeuvre directe du procédé décrit précédemment.

Par "échantillon biologique", on entend tout échantillon, prélèvement ou fraction d'un matériel
20 biologique, simple ou complexe, par exemple un tissu vivant ou un liquide ou fluide corporel. Cet échantillon biologique contient au moins un micro-organisme à lyser, avec ou sans traitement préalable de la structure comprenant ledit micro-organisme, par exemple destruction
25 de l'organisation du tissu.

Par "micro-organisme", on entend tout matériau biologique, comprenant naturellement une membrane ou enveloppe fermée, un ou plusieurs composés biologiques d'intérêt renfermé à l'intérieur de ladite membrane ou
30 enveloppe, par exemple protéiques et/ou nucléiques. A titre d'exemple, on peut citer bien entendu les micro-organismes procaryotes, tels que les bactéries et archaebactéries, les micro-organismes eucaryotes tels que les cellules végétales ou animales et les champignons,
35 également différents tissus vivants, et par extension des particules virales.

Par le terme " lyse ", on entend tout processus permettant de rompre la membrane ou l'enveloppe précitée pour libérer le ou les composés biologiques d'intérêt sous forme totale ou partielle.

5 Par " composé biologique ", on entend tout constituant du micro-organisme, libéré de manière partielle ou totale par l'étape de lyse, comprenant un matériel biologique, notamment nucléique ou peptidique, d'intérêt, au sens où ce dernier est ensuite traité,
10 notamment analysé ou détecté.

Les figures et les exemples qui suivent permettent d'illustrer l'objet de l'invention, mais ne limitent en rien la portée de celle-ci.

La figure 1 illustre le pourcentage de lyse (en
15 ordonnées) en fonction du diamètre des billes (en abscisse) et de la composition du mélange (nature et proportion des billes).

" SI " signifie " solution initiale " et représente le témoin qui n'a pas été lysé.

20 A : Billes de verre de 1 à 50 μm
B : Billes de verre de 50 à 100 μm
C : Billes de verre de 90 à 150 μm
D : Billes de verre 100 μm
E : Billes de zirconium 100 μm
25 F : Billes de zirconium 500 μm
G : Mélange 50/50 de billes de zirconium de 100 et 500 μm .

La figure 2 illustre la quantité d'acides nucléiques de *S.epidermidis* détectée (en ordonnées) en
30 fonction du diamètre des billes (en abscisse).

" SI " signifie " solution initiale " et représente le témoin qui n'a pas été lysé.

35 A : Billes de verre de 1 à 50 μm
B : Billes de verre de 50 à 100 μm
C : Billes de verre de 90 à 150 μm
D : Billes de verre 100 μm

E : Billes de zirconium 100 μm

F : Billes de zirconium 500 μm

G : Mélange 50/50 de billes de zirconium de 100 et 500 μm .

5 La figure 3 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) en tube Eppendorf en fonction du coefficient α (en abscisse).

 La figure 4 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) en tube Falcon en fonction du coefficient α (en
10 abscisse).

 La figure 5 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) dans un contenant en forme de disque en fonction du coefficient α (en abscisse).

 La figure 6 illustre le pourcentage de lyse (en
15 ordonnées) en tube Eppendorf en fonction du coefficient β (en abscisse).

 La figure 7 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) en tube Falcon en fonction du coefficient β (en
20 abscisse).

 La figure 8 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) dans un contenant en forme de disque en fonction du coefficient β (en abscisse).

 La figure 9 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) en fonction de la géométrie du contenant (en
25 abscisse).

A : tube Eppendorf à fond en forme de V, $V_c = 1,5$ ml

B : cuvette de spectrophotométrie à fond plat, $V_c = 5$ ml

30 C : tube à fond plat, $V_c = 30$ ml

D : tube à fond plat, $V_c = 60$ ml

E : bouteille de verre à fond plat, $V_c = 8$ ml

F : bouteille de verre à fond plat, $V_c = 25$ ml

G : tube en polystyrène à fond en forme de U, $V_c =$
35 6 ml

H: tube en polystyrène à fond en forme de U, Vc =
14 ml

I : tube en polystyrène à fond en forme de U, Vc =
22 ml

5 J : tube en polypropylène à fond en forme de U, Vc
= 6 ml

K : tube en polypropylène à fond en forme de U, Vc
= 14 ml

10 L : tube en polypropylène à fond en forme de U, Vc
= 22 ml

M : tube en polypropylène à fond en forme de U, Vc
= 4 ml

15 La figure 10 illustre le pourcentage de lyse (en
ordonnées) en fonction de différentes billes ajoutées (en
abscisse).

La figure 11 illustre le pourcentage de lyse (en
ordonnées) en fonction de combinaisons de différentes
billes ajoutées (en abscisse).

20 A : 10 billes inox de diamètre 2 mm
B : 10 billes de verre de diamètre 3 mm
C : 5 billes inox et 5 billes de verre de
diamètres respectifs 2 et 3 mm

D : 4 billes inox et 4 billes de verre de
diamètres respectifs 2 et 3 mm

25 E : 5 billes inox et 3 billes de verre de
diamètres respectifs 2 et 3 mm

F : 3 billes inox et 5 billes de verre de
diamètres respectifs 2 et 3 mm

30 La figure 12 illustre le pourcentage de lyse (en
ordonnées) en fonction du temps de mise en mouvement de
type vortex (en abscisse) pour les protocoles I et II de
l'exemple 5.

35 La figure 13 illustre le pourcentage de lyse (en
ordonnées) en fonction du temps d mis n mouvem nt de
type vortex (en abscisse) pour les protocoles II et III de
l'exemple 5.

Afin de déterminer l'efficacité du procédé de lyse selon l'invention, on a mis au point un protocole test général d'analyse du lysat obtenu en mesurant le
5 pourcentage de lyse.

Ce protocole général est décrit ci-après.

Des bactéries à paroi Gram+ *Staphylococcus epidermidis* (bioMérieux référence API N° 8149310) cultivées en milieu liquide BCC (Bouillon Coeur Cervele)
10 sont centrifugées à 2500 tours/minute pendant 10 minutes à 25°C, avant d'être resuspendues indifféremment en milieu BCC ou en tampon de lyse à la concentration 5.10^9 cellules /300 µl. La composition du tampon de lyse est la suivante: 30mM Tris-Hcl, 5mM EDTA, 100 mM NaCL, pH 7.2. 300 µl de la
15 suspension sont ajoutés dans un tube contenant préalablement un volume défini de billes de verre. Le tube fermé est vortexé pendant 2 minutes, à puissance maximale de l'appareil (Reax 2000, Heidolph). La suspension bactérienne ainsi traitée est conservée dans la
20 glace avant analyse.

Le pourcentage de lyse est déterminé immédiatement après recueil de l'échantillon, par mesure de la densité optique à 550 nm. Le pourcentage de lyse est égal au rapport de la valeur de DO à 550 nm de la solution
25 bactérienne après vortex sur la valeur de DO à 550 nm avant vortex.

La qualité des acides nucléiques libérés par l'étape de vortex est vérifiée sur gel d'agarose 0,8%. 10 µl du lysat sont déposés par puits, la migration est
30 réalisée sous voltage constant (150V) et le gel est coloré au bromure d'éthidium (BET) avant observation sous rayonnement ultra-violet.

La quantité d'acides nucléiques libérés par l'étape de vortex est déterminée par détection spécifique
35 selon la technique d'hybridation dite sandwich en utilisant l'appareil Vidas commercialisé par bioMérieux

(France). Des sondes oligonucleotidiques de capture et de détection spécifiques des acides nucléiques de *S. epidermidis* (voir le brevet EP 0632269) ont été choisies. Les oligonucleotides de capture et de détection ont
 5 respectivement pour séquence : 5'-GACCACCTGTCACCTCTGTCCC-3' (SEQ ID N°:1) et 5'GGAAGGGGAAACTCTATCTC-3' (SEQ ID N°:2). La sonde de détection est marquée par couplage avec la phosphatase alcaline (PA). L'hybridation spécifique de ces sondes avec les acides nucléiques libérés dans le lysat
 10 est fonction de la quantité d'acides nucléiques présents, mais aussi de leur accessibilité pour les sondes utilisées.

Deux protocoles d'amplification spécifiques des molécules d'ADN et d'ARN de *S. epidermidis* ont été
 15 réalisés à partir des lysats recueillis pour vérifier si les acides nucléiques libérés par vortex peuvent être amplifiés : un protocole PCR pour l'amplification de l'ADN et un protocole NASBA pour l'amplification de l'ARNr16S.

Protocole PCR : la technique de PCR suivie est
 20 celle décrite par Goodman dans *PCR stratégies*, Ed : Innis, Gelford et Sninsky Académie press 1995, pp 17-31. Deux amorces d'amplification ont été utilisées, elles présentent les séquences suivantes

Amorce 1: 5'-ATCTTGACATCCTCTGACC-3' SEQ ID N°:3
 25 Amorce 2: 5'-TCGACGGCTAGCTCCAAAT-3' SEQ ID N°:4
 Les cycles de température suivants ont été utilisés

	1 fois	3 minutes	94°C
		2 minutes	65°C
30	35 fois	1 minute	72°C
		1 minute	94°C
		2 minutes	65°C
	1 fois	5 minutes	72°C

35 Protocole NASBA : la technique de NASBA suivie est celle décrite par Van der Vliet et al., J. Gen.

Microbiol. 1993, 139 : 2423. Deux amorces d'amplification ont été utilisées, elles présentent les séquences suivantes :

Amorce 1: 5'-GGTTTGTCCACCGGCAGTCAACTTAGA-3'

5 Amorce 2: 5'-TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA-3'

10 μ l de lysat ou 5 μ l de lysat sont utilisés pour chaque essai PCR et NASBA, respectivement. Les amplicons produits par PCR sont observés sur gel d'agarose 0.8% et quantifiés sur Vidas selon le protocole décrit ci-dessus.

10 Les amplicons produits après NASBA sont détectés et quantifiés sur microplaque par hybridation avec une sonde de capture et une sonde de détection spécifique de *S. epidermidis*, selon la méthode décrite par P. Cros et al., Lancet 1992, 240 : 870. La sonde de détection est couplée
15 à la peroxidase de Raifort (HRP). Les deux sondes présentent les séquences suivantes :

Sonde de capture: 5'-GATAGAGTTTTCCCTTC-3' (SEQ ID N°: 7)

20 ID N°: 8)
Sonde de détection: 5'-GACATCCTCTGACCCCTC-3' (SEQ

Exemple 1 : Influence du diamètre des billes et du coefficient α sur l'efficacité de la lyse par vortex

25 a- Influence du diamètre des billes.

Le protocole de lyse a été réalisé comme décrit ci-dessus à partir d'une suspension initiale de *Staphylococcus epidermidis* (5.10^9 cellules/300 μ l) en
30 présence de 90 μ l de différents mélanges de billes caractérisées par des diamètres différents, pendant 2 minutes par essai. Les diamètres testés sont compris entre 1 et 500 μ m; les mélanges testés sont les suivants :

A : microbill s de verre de diamètre compris entre
35 1 et 500 μ m,

B : microbilles de verre de diamètre compris entre 50 et 100 μm ,

C : microbilles de verre de diamètre compris entre 90 et 150 μm ,

5 D : mélange homogène de billes de diamètre 100 μm ,

E : mélange homogène de billes de zirconium de diamètre 100 μm

F : mélange homogène de billes de zirconium de diamètre 500 μm

10 G : mélange (50/50 v/v) de billes de zirconium de diamètre 100 et 500 μm ,

Comme l'indique la figure 1, la lyse cellulaire obtenue est la plus efficace en présence de billes de diamètre compris entre 90 et 150 μm , et de préférence égal
15 à 100 μm . Les mesures de densité optique à 550nm des échantillons recueillis après 2 minutes de vortex dans ces conditions indiquent que le pourcentage de lyse de *S. epidermidis* est compris entre 60 et 70% avec ce diamètre de billes. Seule des différences négligeables de
20 pourcentage de lyse sont observées en fonction de la nature des billes (verre ou zirconium) de même diamètre. Par contre l'utilisation de billes de diamètre inférieur ou supérieur à 90 jusqu'à 150 μm , telles les mélanges de billes de diamètre 1 à 50 μm , 50 à 100 μm , 100 à 500 μm ,
25 ou le mélange homogène de billes de diamètre 500 μm entraîne une diminution du pourcentage de lyse. L'analyse sur gel d'agarose 0,8% des acides nucléiques libérés dans les lysats, présentée dans la figure 2, montre que les molécules d'ADN et d'ARNr sont bien conservées puisque
30 leur profil de migration sur gel d'agarose 0,8% est le même que celui des molécules d'ADN et ARNr bactériens purifiés et commercialisés. Les acides nucléiques relargués ont également le même profil de migration qu'il
35 soit le diamètre des billes utilisées pour la lyse cellulaire. Les acides nucléiques libérés sont également détectables par analyse Vidas dont le protocole est décrit

ci-dessus. Toujours d'après la figure 2, la quantité d'acides nucléiques libérés dans les lysats mesurée par analyse Vidas reflète le pourcentage de lyse obtenu. En parallèle, il a été démontré que l'ADN ou l'ARNr 16S de
5 chaque lysat peut être amplifié par protocole PCR ou NASBA spécifiques de *S. epidermidis*, qui sont décrits dans la partie protocole test general ci-dessus.

b- Influence du coefficient α

10

- tube Eppendorf

Le protocole de lyse a été réalisé en présence de billes de diamètre 100 μm , pendant 2 minutes. Des tubes Eppendorfs identiques ont été utilisés pour tous les
15 essais. Le volume de la suspension bactérienne a été fixé à 300 μl /tube pour chaque essai, et le volume de billes a varié entre 1 et 300 μl /tube. Soit V_b , le volume apparent des billes et V_e , le volume de l'échantillon liquide tel que $V_b < V_e$ avec $V_e = \alpha.V_b$ avec α étant un nombre réel
20 positif différent de 0. Le coefficient α a varié de 1 à 300. Après l'étape de vortex, les échantillons recueillis sont analysés par mesure de densité optique à 550 nm, les acides nucléiques libérés dans le lysat sont observés sur gel d'agarose 0,8% et quantifiés par analyse Vidas.

25

La figure 3 indique que la lyse de *S. epidermidis* est efficace pour des valeurs du coefficient α comprises entre 1,4 et 10 : le pourcentage de lyse est compris entre 30 et 70%. Pour des valeurs de $\alpha < 1,4$, le volume de billes étant trop important, le volume mort de la
30 suspension cellulaire augmente de façon telle qu'il est impossible de récupérer le volume initial de la suspension cellulaire. Pour des valeurs de $\alpha > 10$, le volume de billes est faible et la probabilité de rencontre et de choc mécanique entre billes et cellules est réduite. De
35 préférence la lyse cellulaire est plus efficace pour des valeurs de α comprises entre 1,4 et 3,3 : le pourcentage

de lyse étant compris entre 40 et 70%. L'analyse sur gel d'agarose 0,8% du lysat montre que les profils de migration des acides nucléiques libérés ne sont pas modifiés, quelles que soient les valeurs de α . La quantité d'acides nucléiques mesurée par analyse Vidas est directement corrélée au pourcentage de lyse.

- tube Falcon

Une même étude a été réalisée en remplaçant les tubes Eppendorf par des tubes Falcon en polypropylène ($V_c = 6\text{ml}$). La figure 4 indique que la lyse de *S. epidermidis* est efficace pour des valeurs du coefficient α comprises entre 1,4 et 10 : le pourcentage de lyse est supérieur à 20%. De préférence, la lyse cellulaire est plus efficace pour des valeurs de α comprises entre 1,4 et 3,3 : le pourcentage de lyse est compris entre 65 et 85%.

-forme disque

On a utilisé une carte de dimensions $l = L = 8,5\text{cm}$ et $h = 0.4\text{ cm}$. Un ou plusieurs trous, définis comme des puits, sont réalisés de hauteur constante et égale à la hauteur de la carte (soit 0.4 cm) et de diamètre constant. Ces puits sont recouverts d'un film de chaque côté, et chaque puits est rempli d'un mélange de billes de diamètre 100 μm de volume apparent V_b , de 10 billes de fer de diamètre 2 mm et d'une suspension cellulaire de volume V_e . La carte ainsi définie est maintenue sur le vortex.

Le protocole de lyse a été réalisé pendant deux minutes. Des cartes telles que décrites ci-dessus avec un diamètre de 30 cm ($V_c = 2,8\text{ ml/puits}$) ont été utilisées pour chaque essai. Le volume de la suspension bactérienne a été fixée à 700 μl /puits et le volume de billes a varié de 90 à 510 $\mu\text{l/puits}$. Le coefficient α a varié de 1,4 à 7,8. Après l'étape de vortex, le pourcentage d lyse d s échantillons recu illis a été analysé par mesure de densité optique à 550 nm, les acides nucléiques libérés

ont été observés sur gel d'agarose et quantifiés par analyse Vidas.

La figure 5 indique le pourcentage de lyse obtenu en fonction du coefficient α . La lyse de *S.epidermidis* est efficace avec un contenant format "carte" pour des valeurs du coefficient inférieures ou égales à 2,1 : lorsque α est compris entre 1,4 et 2,1, le pourcentage de lyse est compris entre 45% et 75%. De préférence, la valeur optimale du coefficient devrait être inférieure à 1,4 car même pour des valeurs de α s'approchant de 1,4, les valeurs de pourcentage de lyse n'arrivent pas à un plateau. L'analyse sur gel d'agarose 0,8% du lysat montre que les profils de migration nucléiques libérés ne sont pas modifiés quelles que soient les valeurs de α . La quantité d'acide nucléique mesurée par analyse Vidas est directement corrélée au pourcentage de lyse.

Exemple 2 : influence du coefficient β sur l'efficacité de la lyse par vortex

20

- Tube Eppendorf

Le protocole de lyse a été réalisé en présence d'un rapport constant entre le volume apparent de billes et le volume de l'échantillon liquide ($\alpha = V_e/V_b = 3,3$) pendant 2 minutes. Le volume de la suspension bactérienne a varié entre 100 μ l et 1 ml. Soit V_e , le volume de l'échantillon liquide et V_c , le volume utile ou disponible du contenant tel que $V_e < V_c$ et $V_c = \beta.V_e$ avec β étant un nombre réel positif supérieur à 0, le coefficient β a varié de 1,5 à 15. Les expériences ont été réalisées en tube Eppendorf, soit $V_c = 1,5$ ml. Après l'étape de vortex, les échantillons recueillis sont analysés par mesure de densité optique à 550 nm, les acides nucléiques dans le lysat sont observés sur gel d'agarose 0,8% et analysés par analyse Vidas.

Sur la figure 6 est indiqué le pourcentage de lyse obtenu en fonction du coefficient β . La lyse de *S. epidermidis* est plus efficace pour des valeurs du coefficient β compris entre 2,5 et 15 : le pourcentage de lyse est supérieur à 30%. Pour des valeurs de β inférieures à 2,5, les volumes de billes et d'échantillon liquide sont trop importants; ils limitent le mouvement des billes dans l'échantillon et le volume mort de l'échantillon augmente. Pour des valeurs de β supérieures à 15, le volume de l'échantillon est trop faible pour permettre une récupération complète du volume initial de la suspension cellulaire pour $\alpha = 3,3$. De préférence, l'efficacité de lyse cellulaire est meilleure pour des valeurs de β comprises entre 3,75 et 15 : le pourcentage de lyse est compris entre 35 et 60%; de préférence pour des valeurs comprises entre 7,5 et 15 (40 à 60% de lyse). L'analyse sur gel d'agarose 0,8% des lysats montre que les profils de migration des acides nucléiques libérés sont les mêmes quelles que soient les valeurs de β . Les quantités d'acides nucléiques mesurées par analyse Vidas sont directement corrélées aux pourcentages de lyse obtenus.

- tube Falcon

Une étude similaire a été réalisée en utilisant des tubes Falcon de polypropylène ($V_c = 6\text{ml}$) à la place des tubes Eppendorf. Une même valeur du coefficient α a été fixée ($\alpha = 3,3$). Le volume de la suspension bactérienne a varié entre 200 μl et 2ml. β a varié de 3 à 30. La figure 7 illustre le pourcentage de lyse obtenu en fonction du coefficient β . La lyse de *S. epidermidis* est plus efficace pour des valeurs de β comprises entre 6 et 30 : le pourcentage de lyse est supérieur à 50%. Pour des valeurs de $\beta > 30$, le volume de l'échantillon est trop faible pour permettre une récupération complète du volume initial de la suspension cellulaire, pour $\alpha = 3,3$. De

préférence, l'efficacité de la lyse cellulaire est meilleure pour des valeurs de β comprises entre 12 et 30 : le pourcentage de lyse est supérieur à 60%.

5 -forme disque

Le protocole de lyse a été réalisé avec le même contenant utilisé dans l'exemple 1 (diamètre des puits 30 mm, $V_c = 2,8$ ml), avec une valeur de coefficient α ($\alpha = 3,3$) pendant deux minutes. Le volume de la suspension bactérienne a varié de 300 à 700 μ l/puits. Le coefficient β a varié de 4 à 9,3. Après l'étape de vortex, le pourcentage de lyse des échantillons recueillis a été analysé par mesure de densité optique à 550 nm, les acides nucléiques libérés ont été observés sur gel d'agarose et quantifiés par analyse Vidas.

Sur la figure 8 est indiqué le pourcentage de lyse obtenu en fonction du coefficient β . La lyse de *S.epidermidis* est efficace en contenant " format carte " pour des valeurs de β supérieures ou égales à 9,3. Lorsque β est égal à 9,3 avec une valeur non optimale de α ($\alpha = 3,3$), 60% des cellules sont lysées. l'analyse sur gel d'agarose 0,8% du lysat montre que les profils de migration des acides nucléiques libérés ne sont pas modifiés quelles que soient les valeurs de β et sont similaires à ceux décrits pour le format tube. la quantité d'acides nucléiques mesurée par analyse Vidas est corrélée au pourcentage de lyse pour chaque essai.

30 Exemple 3 : Influence de la géométrie du tube sur l'efficacité de la lyse par vortex

Le protocole de lyse a été réalisé dans des contenants de différentes géométries et différents volumes (V_c), en présence de 300 μ l de suspension cellulaire et 90 μ l de billes de diamètre 100 μ m pendant 2 minutes (soit $\alpha = 3,3$ et β variable).

A : tube Eppendorf en polypropylène à fond en forme de V, $V_c = 1,5$ ml

B : cuvette de spectrométrie en polypropylène à fond plat, $V_c = 5$ ml

5 C : tube à fond plat, $V_c = 30$ ml

D : tube à fond plat, $V_t = 60$ ml

E = bouteille de verre à fond plat, $V_c = 8$ ml

F = bouteille de verre à fond plat, $V_c = 25$ ml

10 G = tube en polystyrène à fond en forme de U, $V_c = 6$ ml

H = tube en polystyrène à fond en forme de U, $V_c = 14$ ml

I = tube en polystyrène à fond en forme de U, $V_c = 22$ ml

15 J = tube en polypropylène à fond en forme de U, $V_c = 6$ ml

K = tube en polypropylène à fond en forme de U, $V_c = 14$ ml

L = tube en polypropylène à fond en forme de U, $V_c = 22$ ml

M = tube en polypropylène à fond en forme de U, $V_t = 4$ ml

20 La figure 9 indique le pourcentage de lyse obtenu en fonction de la géométrie du contenant utilisé. Le pourcentage de lyse est compris en moyenne entre 60 et 75% avec les tubes à fond plat ou à fond en forme de V, par contre il est compris en moyenne entre 70 et 80% avec les tubes à fond en forme de U pour un même temps de vortex et
25 une même valeur de α . La mesure par analyse Vidas de la quantité d'acides nucléiques libérés confirme cette influence.

30 Exemple 4 : influence de l'ajout de bill s de plus gros diamètre sur l'efficacité de la lyse par vort x

Le protocole de lyse a été réalisé en tube Eppendorf, en présence de 300 μ l de suspension cellulaire et 90 μ l de billes de diamètre 100 μ m (soit $\alpha = 3,3$ et $\beta = 5$) pendant deux minutes. Différentes billes ont été ajoutées au milieu en combinaison : billes de fer de diamètre 2 mm, billes de verre de diamètre 3 mm.

La figure 10 présente le pourcentage de lyse de *S.epidermidis* en fonction des différentes combinaisons de billes ajoutées. L'addition de bille de fer ou de billes de verre entraîne une augmentation du pourcentage de lyse. Ce pourcentage est sensiblement meilleur en présence de jusqu'à 10 billes/tube. la présence de ces 10 billes ne gêne pas le mouvement des billes de diamètre 100 μ m; par contre au delà de cette valeur, le mouvement est gêné. Le pourcentage de lyse obtenu est plus élevé en présence d'un même nombre de billes de verre par essai que de billes de fer. D'après la figure 11, l'addition de combinaison de billes de fer et de verre permet d'obtenir un pourcentage de lyse aussi élevés qu'en présence de l'addition d'un mélange homogène de billes pour chaque combinaison testée; le pourcentage de lyse est supérieur à 80%. L'analyse sur gel d'agarose 0,8% des acides nucléiques libérés montre que les molécules d'ADN et d'ARNr ont le même profil de migration après lyse quelles que soient les combinaisons des billes utilisées. L'addition des billes de fer et de verre n'altère pas la structure du matériel nucléaire libéré. De plus il a été vérifié que leur présence dans le lysat ne perturbe pas les réactions d'amplification PCR et NASBA.

30

Exemple 5 : Influence du temps de vortex sur l'efficacité de la lyse par vortex

Trois protocoles de lyse ont été réalisés en parallèle :

- Protocole I : tube Eppendorf Vc = 1,5 ml, 90 μ l de bille de diamètre 100 μ m et 300 μ l de suspension cellulaire α = 3,3 et β = 5)

5 - Protocole II : protocole I avec addition de 3 billes de verre de diamètre 3 mm et 5 billes de fer de diamètre 2 mm

- Protocole III : protocole II en tube Falcon (Vc = 6ml) à la place des Eppendorfs.

Pour chaque protocole, différents temps de vortex ont été réalisés.

10 La figure 12 présente le pourcentage de lyse obtenu en fonction du temps de vortex, pour les protocoles I et II. Les conditions expérimentales du protocole I ne sont pas optimales. On confirme qu'après 2 minutes de vortex, seulement 60% des bactéries *S. epidermidis* sont
15 lysées. Par contre il est possible d'améliorer l'efficacité du protocole malgré ces conditions non optimales en augmentant le temps de vortex : dès 8 minutes de vortex, 85% des bactéries sont lysées. Les conditions expérimentales du protocole II sont plus optimales que
20 celles du protocole I, dû à l'addition de billes de diamètre 3 mm : dans ces conditions, 85% des bactéries *S. epidermidis* sont lysées dès 4 minutes de vortex.

La figure 13 présente le pourcentage de lyse obtenu en fonction du temps de vortex pour les protocoles
25 II et III. Les conditions expérimentales du protocole III sont plus optimales que celles du protocole II : 88% des bactéries *S. epidermidis* sont lysées après seulement 2 minutes de vortex alors que seulement 80% ou 60% des bactéries après 2 minutes avec le protocole II ou I,
30 respectivement. La mesure par analyse Vidas des acides nucléiques libérés confirme ces principales observations.

Ainsi, augmenter le temps de vortex permet d'obtenir un pourcentage de lyse élevé lorsque les conditions expérimentales initiales n sont pas optimales
35 .Parallèlement, lorsque ces conditions sont optimales, le temps de vortex peut être court (2 minutes).

Exemple 6 : Universalité du protocole de lyse selon l'invention

Le procédé de lyse selon l'invention peut être
5 appliqué à d'autres espèces cellulaires. Pour cela, le
protocole a été réalisé en tube Eppendorf en présence de
300 μ l de suspension cellulaire de concentration 1.10^9
cellules /ml, de 90 μ l de billes de diamètre 100 μ m avec
un temps de vortex égal à 8 minutes. Différentes cellules
10 ont été respectivement utilisées (*Mycobacterium gordonae*,
Escherichia coli, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus*
pneumoniae, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus sp.*,
Actinomyces viscosus, *Actinomyces naeslundii*,
Stomatococcus mucilaginosus, *Nocardia asteroides*,
15 *Rhodococcus sp.*). Les résultats obtenus indiquent que le
pourcentage de lyse pour chacun des cas analysés est
compris entre 80 et 90%. Les profils de migration sur gel
d'agarose 0,8% des acides nucléiques libérés dans chaque
lysats sont similaires pour chaque souche bactérienne
20 testée, et sont similaires à celui d'ADN et ARNr 16S d'*E.*
coli purifiés et commercialisés.

Exemple 7 : Sensibilité du protocole de lyse selon l'invention

25 Les acides nucléiques ADN et ARNr 16S libérés par
lyse selon le procédé de l'invention ont été soumis à une
amplification. Les conditions de lyse sont les mêmes que
celles indiquées dans l'exemple 6. La souche bactérienne
utilisée est *S. epidermidis*. Deux protocoles
30 d'amplification spécifiques des acides nucléiques de *S.*
epidermidis ont été réalisés à partir des lysats
recueillis, soit un protocole PCR pour l'amplification de
l'ADN, soit une protocole NASBA pour l'amplification d
l'ARNr 16S, comme décrits ci-dessus dans le protocole test
35 général.

1)- Amplification PCR de l'ADN libéré

Des concentrations initiales de 1.10^9 à 1.10^2 cellules /ml ont été utilisées. 10 μ l de lysat ont été utilisés pour chaque essai PCR. Les amplicons produits ont été détectés et quantifiés après hybridation sandwich spécifique sur Vidas, comme décrit dans le protocole test général. Les amplicons produits sont mesurables pour des concentrations bactériennes initiales au moins supérieures ou égales à 1.10^2 cellules /ml, soit 30 cellules /300 μ l. Ainsi le protocole de lyse optimisé par vortex est efficace pour lyser au moins 30 cellules /300 μ l et pour libérer des molécules d'ADN amplifiables par PCR de sorte que la quantité d'amplicons produits soit détectables.

2)- Amplification NASBA de l'ARNr 16S

Des concentrations initiales de 2.10^9 à 2.10^2 cellules /ml ont été utilisées. 5 μ l de lysat ont été utilisés pour chaque essai NASBA. Les amplicons produits ont été détectés et quantifiés sur microplaque par hybridation sandwich avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques de *S. epidermidis*, comme décrit dans le protocole test général. Les amplicons produits ont pu être détectés et mesurés pour des concentrations bactériennes initiales au moins supérieures ou égales à 2.10^2 cellules /ml, soit 60 cellules /300 μ l. La quantité d'amplicons mesurée est importante pour cette concentration initiale, ce qui indique que probablement des amplicons produits après lyse de bactéries de concentration initiale inférieure à 60 cellules /300 μ l seraient détectables et mesurables.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de lyse de micro-organisme, pour libérer au moins un composé biologique comprenant une étape de lyse, selon laquelle:

- 5 - on dispose dans un contenant un échantillon biologique en milieu liquide, comprenant le micro-organisme à lyser,
- on dispose dans ledit contenant au moins un matériau particulaire, relativement dur, et
- 10 substantiellement inerte par rapport aux composés biologiques,
- on soumet le mélange de l'échantillon biologique et du matériau particulaire à un mouvement de type vortex, **caractérisé en ce que:**
- 15 - le matériau particulaire comprend des billes ayant un diamètre compris entre 90 et 150 μm , et
- $V_e = \alpha \cdot V_b$, avec
- V_b = le volume apparent des billes,
- V_e = le volume de l'échantillon liquide, et
- α est un nombre compris entre 1,4 et 10 lorsque le contenant est de forme tubulaire, et
- α est un nombre inférieur ou égal à 2,1 lorsque
- 20 le contenant est de forme disque.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le matériau particulaire est constitué de billes de diamètre environ 100 μm .

25

3. Procédé selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que

$$V_b < V_e < V_c, \text{ et}$$

$$V_c = \beta \cdot V_e, \text{ et}$$

β est un nombre supérieur ou égal à 2,5, avec

30 V_b = le volume apparent des billes,

V_e = le volume de l'échantillon liquide,

V_c = le volume utile du contenant.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le contenant est de forme tubulaire, de préférence à fond en forme de U.

5 5. Procédé selon les revendications 1 et 4, caractérisé en ce que β est un nombre compris entre 2,5 et 30.

10 6. Procédé selon les revendications 1 et 3, caractérisé en ce que le contenant est un tube à fond tronconique, et α est un nombre compris entre 1,4 et 3,3, et β est un nombre compris entre 2,5 et 15, de préférence entre 3,75 et 15.

15 7. Procédé selon les revendications 1 et 3, caractérisé en ce que le contenant est un tube à fond en forme de U, et α est un nombre compris entre 1,4 et 3,3, de préférence est égal à 3,3, et β est un nombre compris entre 3 et 30, de préférence entre 12 et 30, de préférence
20 encore égal à 20.

8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le contenant est sous forme disque.

25 9. Procédé selon les revendications 1 et 8, caractérisé en ce que α est un nombre inférieur ou égal à 1,4 et β est un nombre supérieur ou égal à 9,3.

30 10. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le matériau particulaire comprend d'autres billes ayant un diamètre supérieur à celui desdites billes du contenant.

35 11. Procédé selon les revendications 1 et 10, caractérisé en ce que le contenant comprend jusqu'à 10 autres billes.

12. Procédé selon les revendications 1 et 10, caractérisé en ce que les autres billes ont un diamètre environ de 2 à 3 mm.

5

13. Procédé selon le revendication 1 caractérisé en ce que le temps de mise en mouvement de type vortex est au moins égal à 10 secondes, de préférence au moins égal à 20 secondes, avantageusement entre 1 et 5 minutes.

10

14. Procédé selon les revendications 1 et 13 caractérisé en ce que le temps de mise en mouvement de type vortex est d'environ 2 minutes.

15

15. Procédé selon les revendications précédentes, caractérisé en ce que les micro-organismes sont des bactéries.

16. Utilisation du lysat obtenu par le procédé selon les revendication 1 à 15 pour l'amplification de molécules d'ADN et/ou d'ARN.

17. Utilisation du lysat obtenu par le procédé selon la revendications 16 pour la détection et/ou la quantification de molécule d'ADN et/ou d'ARN.

18. Contenant à usage unique, pour la mise en oeuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend une charge d'un matériau particulière adaptée, en fonction d'une quantité prédéterminée de l'échantillon biologique, à la mise en oeuvre directe du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

1/7

FIGURE 1

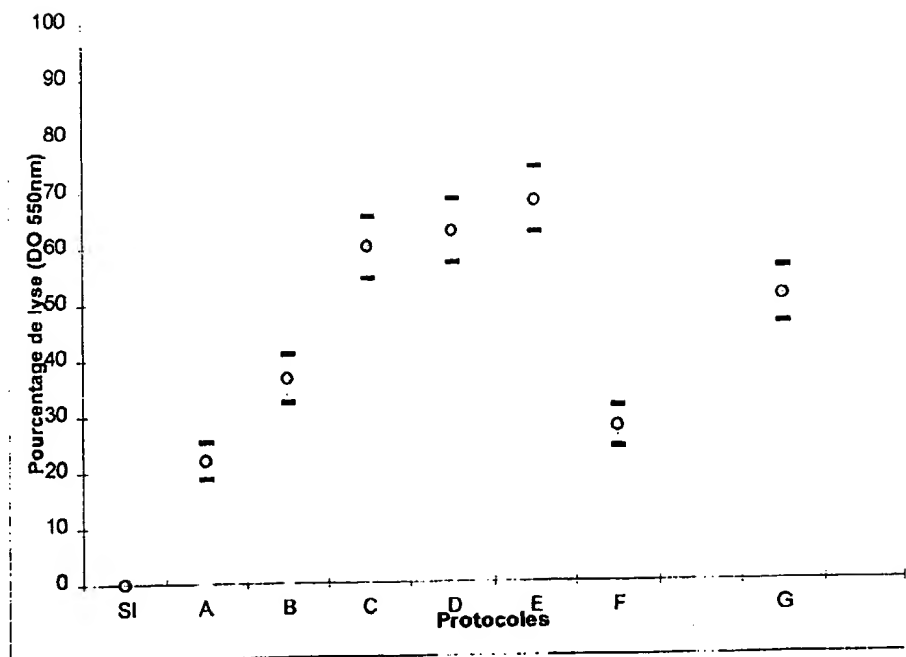
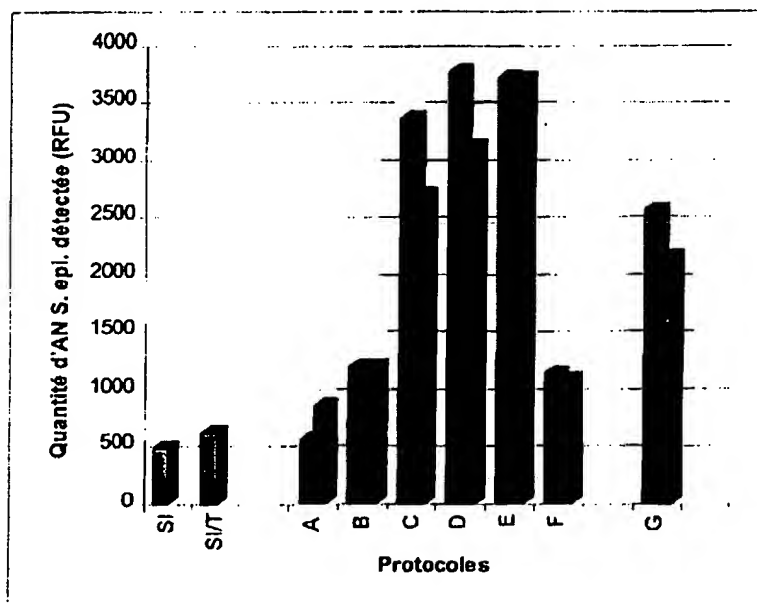


FIGURE 2



2/4

FIGURE 3

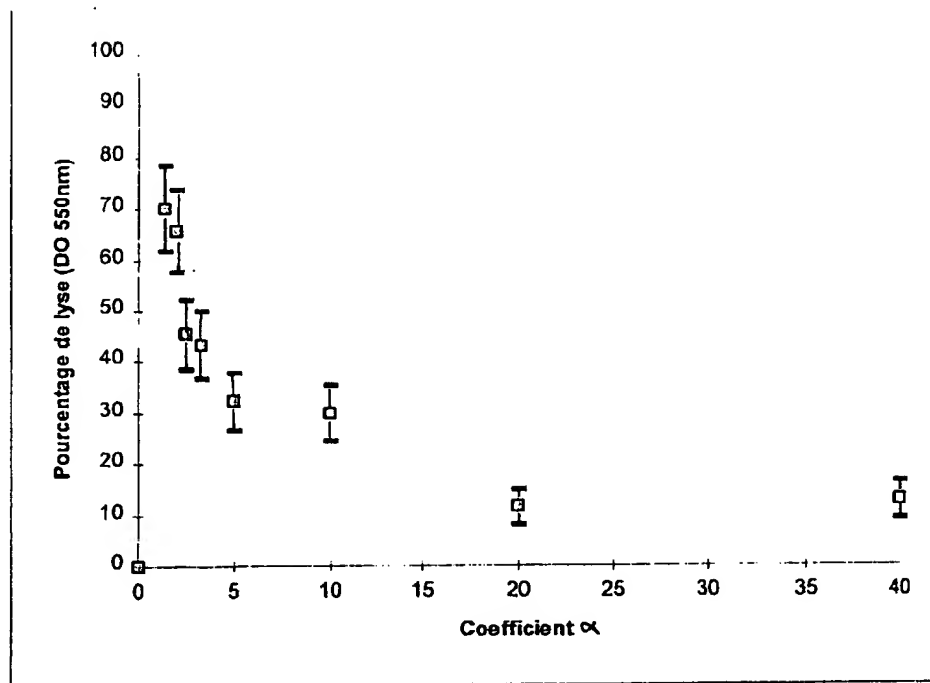


FIGURE 4

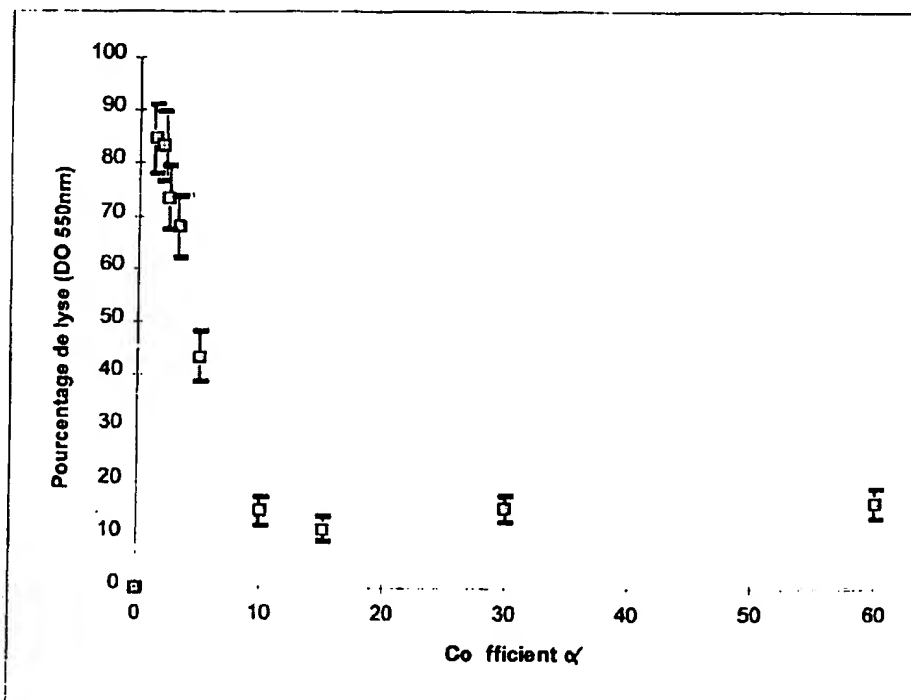


FIGURE 5

3/7

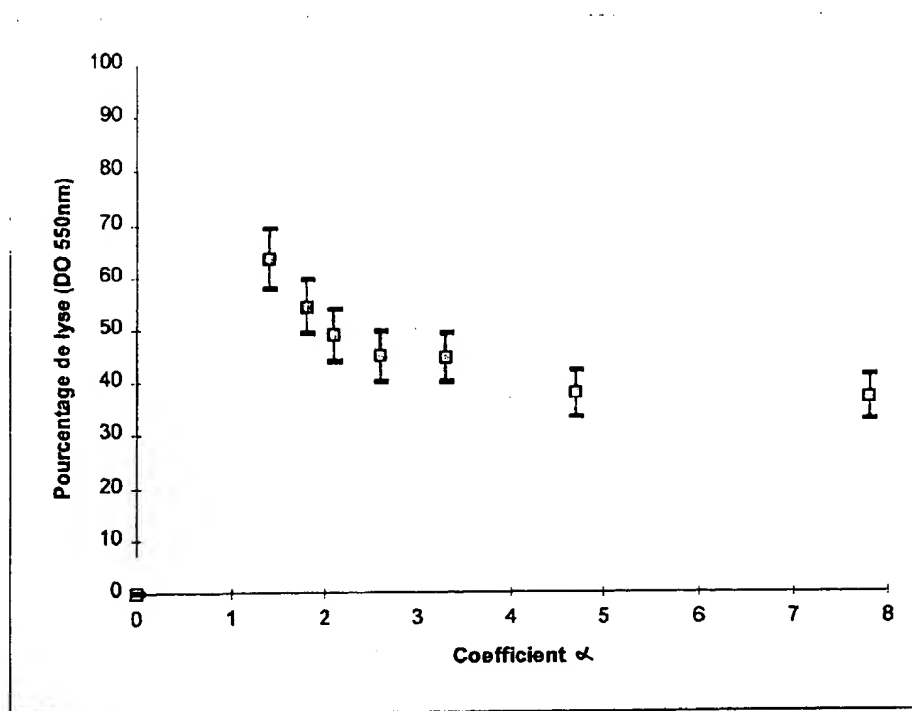


FIGURE 6

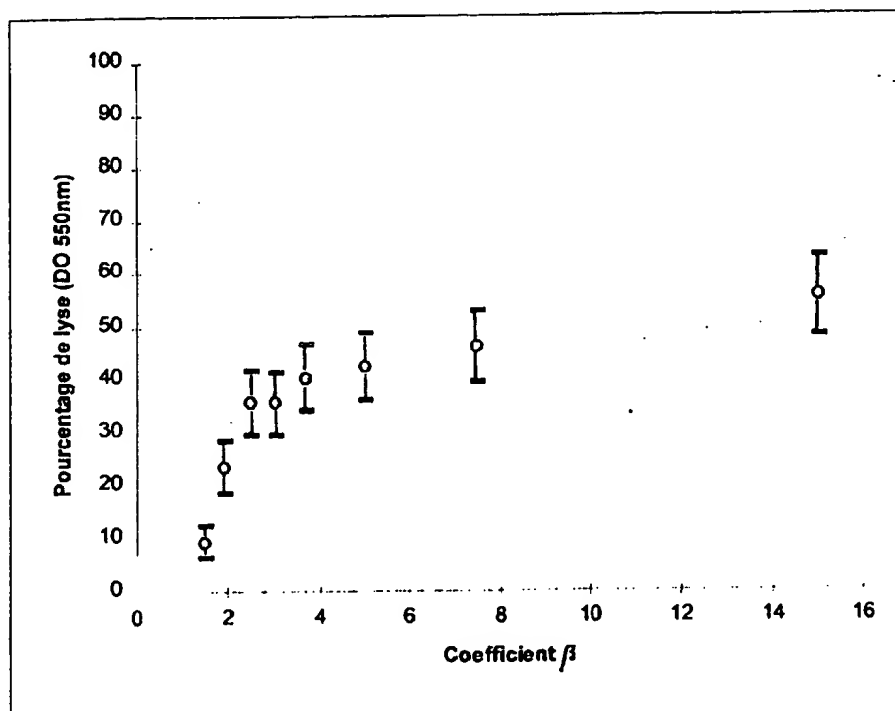


FIGURE 7

4/7

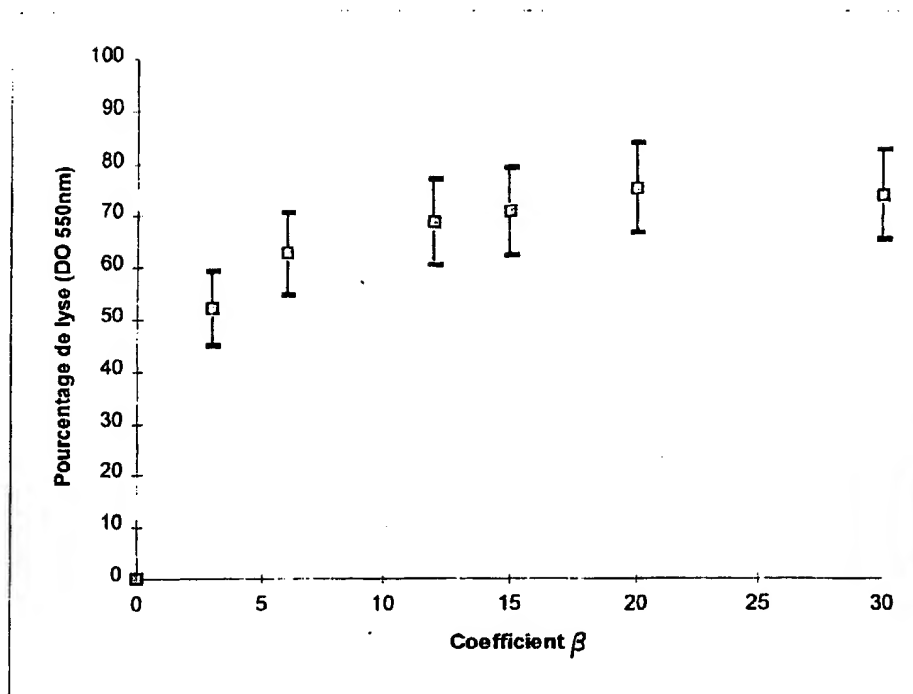
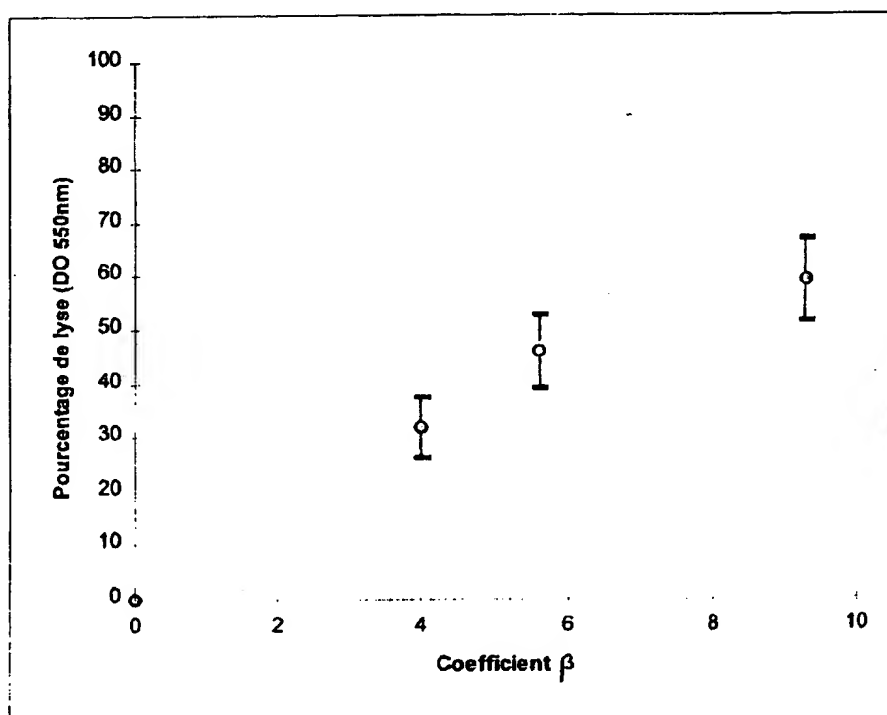
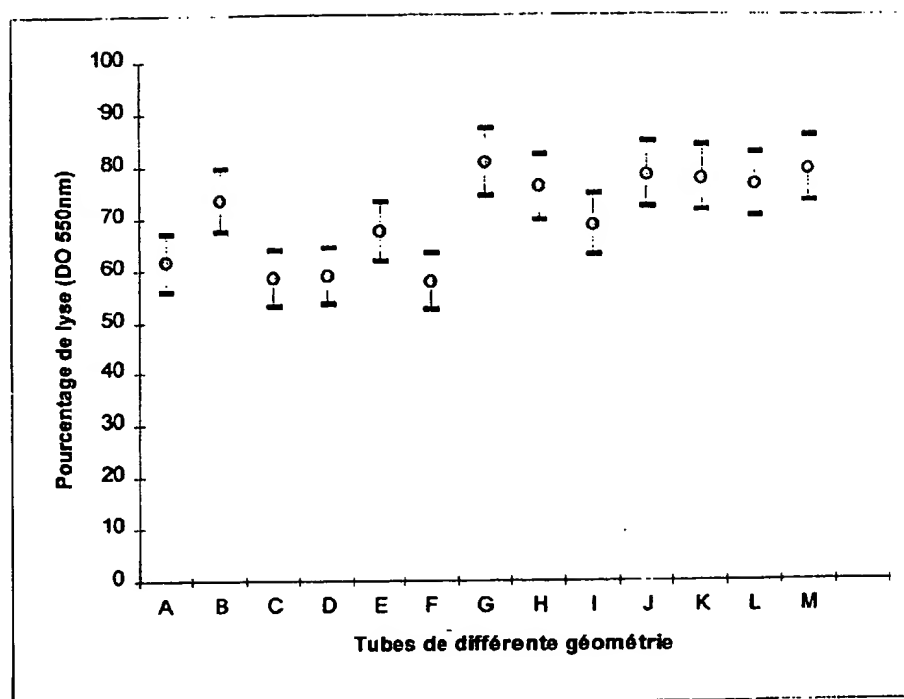


FIGURE 8



5/7

FIGURE 9



6/7

FIGURE 10

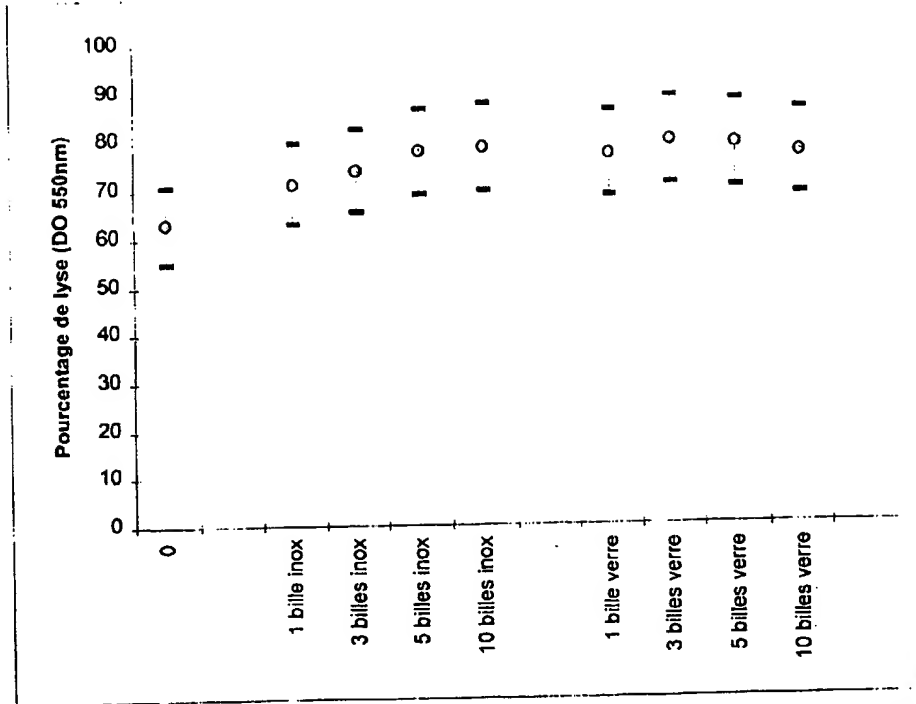
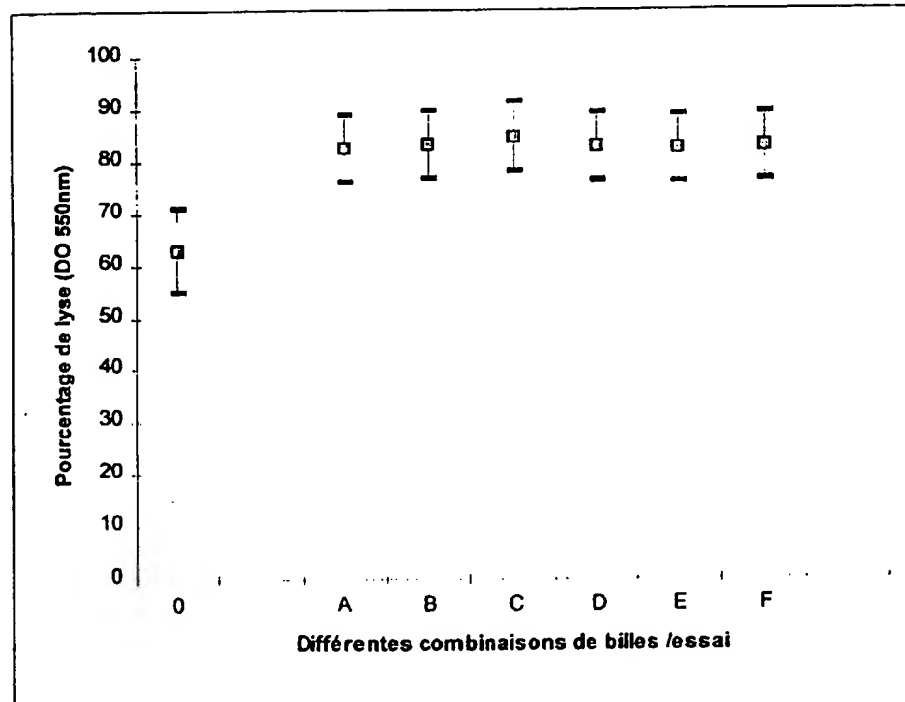


FIGURE 11



7/7

FIGURE 12

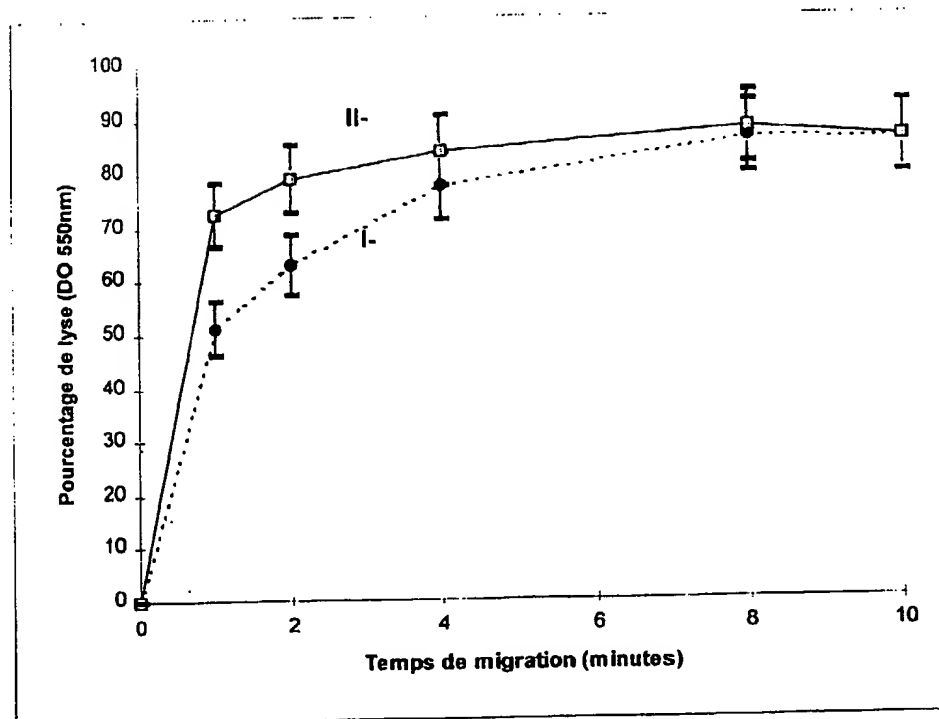
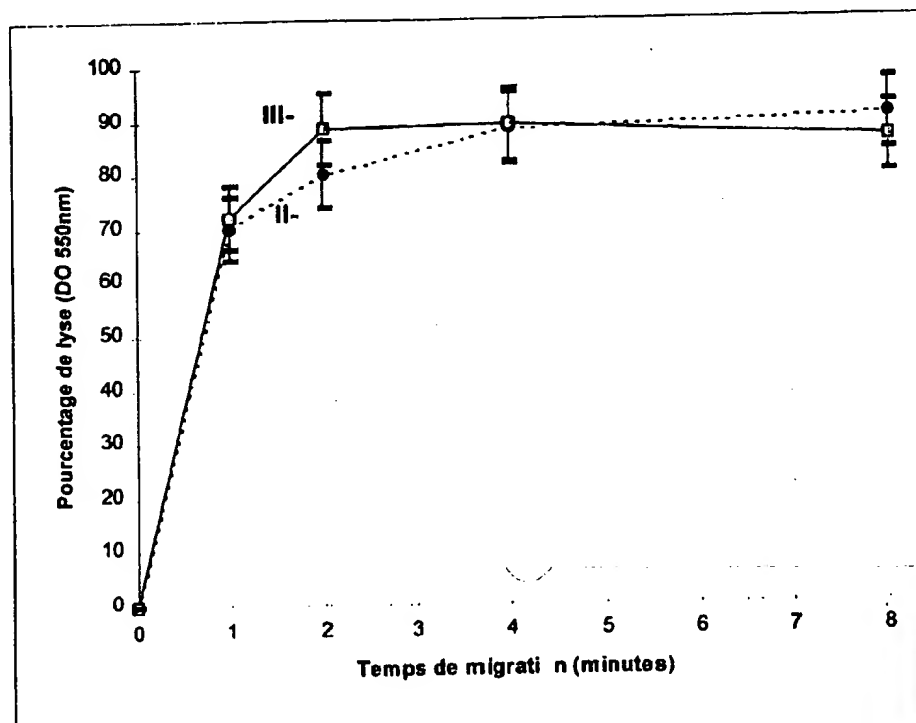


FIGURE 13



INSTITUT NATIONAL

de la

PRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revindications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 553311
FR 9712164

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	US 5 643 767 A (FISCHETTI VINCENT A ET AL) 1 juillet 1997	1,2,4,6, 10-12, 15-18
Y	* colonne 1, ligne 1 - ligne 32; revendications 1-3; figures 1-4; exemples 1-6 * * colonne 7, ligne 53 - ligne 60 *	1-5,7,9, 14-18
X	US 4 295 613 A (MOORE W EDWARD C ET AL) 20 octobre 1981	1,2,6, 15,18
Y	* revendications 1,7 *	3,5,7,9, 14
X	FR 1 576 299 A (VYZKUMNY USTAV ORGANICKYCH SYNTHEZ PARDUBICE RYBITVI) 25 juillet 1969	1,2,8, 15,18
Y	* page 4, ligne 23 - ligne 27; revendications; figure *	
Y	EP 0 317 803 A (ABBOTT LAB) 31 mai 1989	1,2
E	EP 0 796 917 A (BECTON DICKINSON CO) 24 septembre 1997	1,2,6, 10,15-18
Y	* page 3, ligne 28 - ligne 32; revendications 1-6,9; figures *	3,5,7,9, 14
X	& AU 15108 97 A 18 septembre 1997	
Y	EP 0 288 618 A (GEN PROBE INC) 2 novembre 1988	1,2, 15-18
X	US 5 464 773 A (MELENDEZ LUIS A ET AL) 7 novembre 1995	1,10
	* colonne 2, ligne 14 - ligne 24; revendications *	
	-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
30 juin 1998		Coucke, A
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 553311
FR 9712164

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	US 4 666 850 A (MEHL JACK J ET AL) 19 mai 1987 * revendications; figures *	1-5,7,9, 14
Y	EP 0 341 215 A (CIBA GEIGY AG ;UCP GEN PHARMA AG (CH)) 8 novembre 1989 * revendications *	3,5,7,9, 14
Y	EP 0 284 044 A (ZYMOGENETICS INC) 28 septembre 1988 * page 7, alinéa 4; revendications *	3,5,7,9, 14
Y	US 4 775 622 A (HITZEMAN RONALD A ET AL) 4 octobre 1988 * revendications; exemples *	3,5,7,9, 14
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche 30 juin 1998		Examineur Coucke, A
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 1503 03/92 (P04C19)